

образом, наши данные свидетельствуют о том, что хроническое ингибирование iNOS приводит к снижению продукции больших количеств NO в ходе развития ЛГ. Снижение повреждающего воздействия повышенной продукции NO на сосудистые ткани в свою очередь привело к восстановлению нарушенного при монокроталиновой ЛГ эндотелий-зависимого расслабления легочных сосудов.

ВКЛАД СУПЕРОКСИД-АНИОНА В РЕГУЛЯЦИЮ КОРОНАРНОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ И СОКРАТИТЕЛЬНОЙ ФУНКЦИИ МИОКАРДА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ РАЗНОЙ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ

Дорошенко А.С.

***Витебский государственный медицинский университет,
центральная научно-исследовательская лаборатория, Витебск***

The aim of investigation - to find out a role of superoxidanion and nitric oxide in regulation of tone of coronary vessels in normal state, and after 0,5 and 6 hours immobilization stress. Experiments have been conducted on female Vistar's rats. Stress was caused by means of 0,5 and 6 hours immobilization of rats in supine position without head fixation. A coronary blood flow and contractile myocardial function were studied on Langendorf's hearts, perfused in constant pressure and contracting in spontaneous rhythm. 4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid (tirone), 10 mM/l or methyl ether N-w-nitro-L-arginine 60 μ M/l, Sigma USA was added to the perfusion solution. Results show that binding of superoxidanion and tirone in the control have expressed vasodilatatory action only in conditions of intact systems of nitric oxide synthesis. At short-term immobilization stress role NO in regulation contractive activity of smooth muscles and a myocardium is reduced, and the role of superoxidanion in mechanisms of such regulation essentially grows. At long stress superoxidanion plays a double role during regulation of a tone of vessels on the one hand, due to high reactionary ability it is the damaging agent, and with another, cooperating with NO corrects his influence on a tone of vessels, thus participating during endocellular signaling.

Важнейшей причиной нарушения тонуса артериальных сосудов при стрессе является активация эндотелиоцитов. Это приводит к гиперпродукции NO и активных форм кислорода, в частности супероксид-аниона, запускающего целый каскад окислительных реакций [1; 2; 5].

Известно, что в физиологических условиях и при патологии монооксид азота и супероксид-анион взаимодействуют друг с другом, образуя пероксинитрит. Остается малоизученным вопрос как это взаимодействие влияет на тонус сосудов сердца и сократительную функцию миокарда при различной длительности воздействия стрессора. В связи с этим, целью исследования, было выяснить роль супероксида и монооксида азота в регуляции тонуса коронарных сосудов в норме, при полу- и шестичасовом стрессорном воздействии.

Материалы и методы

Опыты были проведены на 33 крысах-самках линии Вистар массой 180-240 г. Стресс вызывали посредством 0,5, 6-ти часовой иммобилизации крыс на спине без фиксации головы. Сердце изолировали сразу после 0,5-ти и спустя 90 минут после окончания 6-ти часовой иммобилизации [4]. Контрольные крысы не подвергались стрессу. Они содержались в таких же условиях, как и опытные крысы и получали такой же рацион питания.

Коронарный поток и сократительную функцию миокарда изучали на препаратах изолированного сердца, перфузируемого в условиях постоянного давления и сокращающихся в спонтанном ритме. Сердце перфузировалось раствором Кребса - Хензелята следующего состава (мм/л): NaCl – 118; KCl – 4,8; MgSO₄ 1,18; KH₂PO₄ -1,2; CaCl₂ – 2,5; NaHCO₃ – 25,0; глюкоза - 5,5; pH – 7,3-7,4; насыщенным карбогеном (95% O₂ и 5% CO₂) при температуре 36,5°C. Постоянную температуру поддерживали при помощи ультратермостата UTU-4 (Польша). Перфузат не рециркулировал, что позволяло поддерживать его состав постоянным на протяжении всего опыта. В перфузионный раствор добавляли либо тирон (4,5-дигидрокси-1,3-бензенидисульфоновая кислота 10 мм/л, Sigma USA), являющийся внутриклеточной химической ловушкой супероксид-аниона; либо ингибитор NO-синтазы (L-NAME - метиловый эфир N-ω-нитро-L-аргинина 60 мкМ/л, Sigma USA); либо тирон и L-NAME.

Каждый опыт состоял из двух этапов. В первой серии экспериментов изучалось влияние тирона на тонус коронарных сосудов: на первом этапе сердце перфузировалось обычным раствором, на втором этапе – этим же раствором, но с добавлением тирона. Во второй серии экспериментов изучали сочетанное влияние L-NAME и тирона: на первом этапе в перфузионный раствор вводили L-NAME, на втором - L-NAME и тирон. Величину коронарного потока определяли по объему перфузионной жидкости, оттекающей через свободный правый и дренированный левый желудочки за 10 секунд. В ходе опыта перфузионное давление ступенчато повышали от 40 до 120 мм рт.ст. с шагом в 20 мм рт.ст. (коронарная ауторегуляция). Коронарный расширительный резерв определяли как отношение между величиной коронарного потока, найденного после 60-ти

секундного прекращения перфузии (максимальный гиперемический коронарный поток, МГКП) и исходным потоком. Степень изменения коронарного потока по мере увеличения перфузионного давления, оценивали по индексу ауторегуляции, предложенному Е.Б.Новиковой (1972) [3]. В полость левого желудочка через разрез в ушке левого предсердия вводили латексный баллончик, полость которого соединялась с электроманометром. Запись кривой внутрижелудочкового давления осуществляли электроманометром МХ-01 на одноканальном самописце Н 338-1 [3; 6].

Цифровой материал обработали методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В изолированном сердце крыс, перенесших 0,5 часовую иммобилизацию, не наблюдалось достоверных изменений объемной скорости коронарного потока (ОСКП), определяемой при разных уровнях перфузионного давления. Растяжимость коронарных сосудов достоверно снижалась после 0,5-ти часовой иммобилизации на 25% и 33% при перфузионном давлении 60 и 100 мм рт. ст. Индекс ауторегуляции при 0,5-ти часовом стрессе не изменялся. У крыс, перенесших 0,5-ти часовой иммобилизационный стресс, коронарный расширительный резерв снижался на 13% и 26% при перфузионном давлении 40 и 80 мм рт. ст. Это снижение было обусловлено уменьшением максимального гиперемического коронарного потока на 26%, при перфузионном давлении 80 мм рт. ст. Под влиянием 0,5-ти часового стресса снижения развиваемого внутрижелудочкового давления не наблюдалось. Диастолическое давление в ходе опыта устанавливалось на уровне 15 ± 4 мм рт. ст.

После 6-ти часовой иммобилизации, как отмечалось нами ранее [1], ОСКП увеличилась на 22-28% при перфузионном давлении 60-120 мм. рт. ст. Растяжимость коронарных сосудов снижалась при перфузионном давлении 80 и 120 мм. рт. ст. на 39% и 32%. Индекс ауторегуляции при подъеме перфузионного давления от 60 до 80 от 80 до 100 от 100 до 120 мм рт. ст. уменьшился на 45%, 31%, 25%, соответственно. Коронарный расширительный резерв при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт. ст. также уменьшился на 20% и 14% . В связи с тем, что МГКП не изменялся, падение коронарного расширительного резерва было связано с увеличением исходной ОСКП в результате постстрессорного снижения тонуса коронарных сосудов. Развиваемое внутрижелудочковое давление при перфузионном давлении 60-120 мм рт. ст. было достоверно более низким на 15-19%, по сравнению с контролем. Диастолическое давление в ходе опыта устанавливалось на уровне 15 ± 4 мм рт. ст.

Добавление тирона в перфузионный раствор, сопровождалось увеличением ОСКП при ПД 80-120 мм.рт. ст. на 21-37%, снижением

растяжимости коронарных сосудов на 17-34% при ПД 60, 100 и 120 мм рт. ст., ИА на 17-56%, коронарного расширительного резерва на 14-22% при всех уровнях ПД. Тирон на оказывал влияния на величину МГКП.

РВД, в условиях действия тирона, уменьшилось на 27-37% при всех уровнях ПД. Диастолическое давление в ходе опыта не изменялось.

Важно отметить, что отмена введения тирона в течении нескольких секунд приводила к полному восстановлению исходных показателей коронарного потока и сократительной функции миокарда. Таким образом, эффект тирона напоминает изменения коронарного потока и сократительной функции миокарда, наблюдающиеся в изолированном сердце крысы, перенесшей 6-ти часовую иммобилизацию.

Блокада синтеза монооксида азота L-NAME в контроле, сопровождалась характерным снижением ОСКП на 29-49% при ПД 60-120 мм рт. ст., ИА на 15-22%, КРР на 19%. Падение КРР резерва было обусловлено снижением величин МГКП на 21%, при ПД 80 мм. рт. ст.

Под влиянием L-NAME РВД и диастолическое давление достоверно не изменялось. На фоне блокады синтеза монооксида азота, в отличие от контроля, тирон не оказывал влияния на ОСКП. Коэффициент растяжения, ИА, МГКП уменьшались, что является характерным для действия только L-NAME.

В условиях блокады синтеза NO, так же как и в контроле, под влиянием тирона наблюдалось еще большее снижение РВД на 36-43%. Диастолическое давление в ходе опыта не изменялось и составляло 6 ± 2 мм рт. ст.

Таким образом, связывание супероксид аниона оказывает выраженное коронародилататорное действие только в условиях интактной системы синтеза монооксида азота. Это дает нам возможность предположить, что тирон оказывает влияние на тонус коронарных сосудов, в первую очередь, изменяя функцию эндотелиоцитов, так как влияние супероксиданиона и NO оказались взаимосвязанными. В то же время, супероксид и монооксид азота также участвуют в регуляции сократительной функции миокарда. Однако их взаимодействие оказывается гораздо менее слабым.

Интракоронарное введение тирона в изолированное сердце крыс, перенесших 0,5 часовую иммобилизацию, не сопровождалось характерным для контроля увеличением ОСКП, снижением индекса ауторегуляции и коронарного расширительного резерва. Развиваемое внутрижелудочковое давление уменьшалось на 29-37% при всех уровнях перфузионного давления. Диастолическое давление не изменялось. Обращает на себя внимание тот факт, что отмена введения тирона в течении нескольких секунд приводила к полному восстановлению исходных показателей коронарного потока и сократительной функции миокарда. При добавлении в раствор L-NAME ОСКП в изолированном сердце крыс, перенесших 0,5-

ти часовой стресс снижалось на 24-42%, растяжимость сосудов сердца уменьшалась на 33-65%, а индекс ауторегуляции - на 28%.

Под влиянием L-NAME наблюдалось характерное снижение величины МГКП на 26% и 34%, при перфузионном давлении 80 и 120 мм рт. ст. и, как результат, коронарный расширительный резерв уменьшался на 13% и 15%. Блокада синтеза монооксида азота не оказала влияния в этой группе крыс на величину развиваемого внутрижелудочкового давления.

Сочетанное введение L-NAME и тирона в перфузионный раствор сопровождалось уменьшением ОСКП на 20% при перфузионном давлении 40 мм. рт. ст. и на 37-54% при перфузионном давлении 60-120 мм рт. ст., а МГКП снижалось на 34% и 51% при перфузионном давлении 80 и 120 мм. рт. ст. Изменения растяжимости, индекса ауторегуляции и коронарного расширительного резерва были такими же как и при действии только L-NAME. В то же время, на фоне блокады синтеза NO, тирон оказал более выраженное, чем только L-NAME, вазоконстрикторное действие, существенно подавляя при этом развитие МГКП. Развиваемое внутрижелудочковое давление, в сердце крыс перенесших стресс, под воздействием L-NAME и тирона снижалось также в большей степени (на 39-45%), чем под влиянием только тирона. Введение тирона в раствор для перфузии сердца крысы перенесшей 6-ти часовую иммобилизацию сопровождалось увеличением ОСКП на 32-58%, по отношению к контролю. Коронарный расширительный резерв снизился на 23-30%. ИА уменьшался на 33-64% при ПД 60-120 мм рт. ст. Растяжимость сосудов снижалась на 36% и 33%, при ПД 100 и 120 мм рт. ст., РВД уменьшалось на 27-46% на всех уровнях перфузионного давления. При добавлении в раствор L-NAME, ОСКП, снижалось на 20%, 25%, соответственно, при ПД 100, 120 мм рт. ст. ИА снижался при ПД 80 мм рт. ст. на 32%, МГКП на 17% и 25% при ПД 80 и 120 мм рт. ст., растяжимость коронарных сосудов снизилась на 32-52%, РВД уменьшилось на 18-20% при всех уровнях ПД. Это согласуется с полученными нами ранее результатами. На фоне сочетанного применения L-NAME и тирона ИА снизился на 36% и 30% при ПД 40 и 80 мм рт. ст., МГКП на 23% и 25%, КРР на 20 и 22% при ПД 80 и 100 мм рт. ст., растяжимость коронарных сосудов на 40-54%, РВД уменьшалось на 26-45% при всех уровнях ПД. Диастолическое давление в ходе опытов не изменялось.

Таким образом, 0,5-ти часовой стресс не изменял тонус коронарных сосудов, сократительную функцию миокарда, но сопровождался нарушением развития реактивной гиперемии. В связи с тем, что выраженность реактивной гиперемии зависит от функционального состояния эндотелиоцитов, снижение величины МГКП после 0,5 часового стресса может свидетельствовать о возникновении при кратковременном

стрессе дисфункции эндотелия, сопровождающейся снижением биологической активности NO.

Уменьшение содержания супероксид-аниона в клетках коронарных сосудов, на фоне блокады синтеза NO при полчасовом иммобилизационном стрессе, приводило к еще более существенному увеличению ригидности коронарных сосудов, чем после блокады только синтеза NO. Это свидетельствует о том, что супероксид-анион играет важную роль в регуляции сосудистого тонуса при кратковременном стрессе. Причем его действие сходно с действием NO. Можно предположить, что при кратковременном стрессе, вазодилаторный эффект супероксид-аниона, опосредован перекисью водорода, (образующейся при участии супероксиддисмутазы) роль которой в регуляции сосудистого тонуса при интенсивном кратковременном стрессорном воздействии вероятно возрастает.

Обращает на себя внимание тот факт, что после иммобилизационного стресса связывание тироном супероксид-аниона на фоне блокады синтеза NO приводит к выраженному подавлению сократительной функции миокарда. Следовательно, в отличие от контроля, в условиях стресса возрастает роль супероксид-аниона и NO в поддержании определенного уровня сократительной активности миокарда. Таким образом, при кратковременном стрессорном воздействии снижается роль NO в регуляции сократительной активности гладких мышц и миокарда, а роль супероксид-аниона в механизмах такой регуляции существенно возрастает.

Так как после перенесенной 6-ти часовой иммобилизации, на фоне введения в перфузионный раствор тирона – ловушки супероксиданиона, отмечалось еще более значительное, чем в контроле, снижение сосудистого тонуса, что вероятно может быть связано, как с вазодилаторным действием монооксида азота, количество которого при этом возрастает, так и с повреждающим действием активных форм кислорода и азота на тонус гладких мышц сердца. Следовательно, супероксиданион играет двоякую роль в процессах регуляции тонуса сосудов при продолжительном стрессе: с одной стороны, за счет высокой реакционной способности он является повреждающим агентом, а с другой, взаимодействуя с NO корректирует его влияние на тонус сосудов тем самым участвуя в процессах внутриклеточного сигналинга.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, договор Б03-240.

Литература

1. Беляева Л.Е., Шебеко В.И., Солодков А.П., Долженкова Е.В. Возможность коррекции нарушений тонуса коронарных сосудов при острой кровопотере N-ацетилцистеином // Дисфункция эндотелия:

экспериментальные и клинические исследования. Труды II республиканской научно-практической конференции. Витебск 2002 С. 71-76.

2. Солодков А.П. Эндотелиальные механизмы изменения сосудистого тонуса: Автореф. дис. д-ра мед. наук. – Витебск: ВГМУ, 1998. – 28 с
3. Новикова Е.Б. Об ауторегуляции в коронарной системе. // Физиол. журнал N 1 1972, с.61-74.
4. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. // М. Медицина, 1984.
5. Шебеко В.И. Эндотелий и система комплемента. // Витебск: ВГМУ, 1999. – С. 108–116.
6. Weisfeldt M., Shock N. Effect of perfusion pressure of coronary flow and oxygen usage of non working heart. // Am. J. Physiol. V. 218(1)P. 95-101, 1970

ВЛИЯНИЯ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА НА ТОНУС КОРОНАРНЫХ СОСУДОВ И СОКРАТИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИОКАРДА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

Дорошенко А.С., Солодков А.П., Шебеко В.И.

*Витебский государственный медицинский университет,
центральная научно-исследовательская лаборатория, г. Витебск*

The purpose of the research was to study the influence of intracoronary infusion of N-acetyl- L-cysteine to the level of coronary blood flow auto regulation, coronary dilatation reserve and contractive activity of a myocardium of the rats who have undergone 0,5 and 6 hours immobilization stress. Experiments have been conducted on female Vistar rats. Stress was caused by means of 0,5 and 6 hours immobilization of rats in supine position without head fixation. A coronary stream and contractive function of a myocardium were studied on Langendorff hearts, perfused in conditions of constant pressure and contracting in spontaneous rhythm. N-acetyl- L-cysteine (NAC, 1 mM / 1 - Sigma USA) was added to the perfusion solution. After 0,5 hours immobilization stress there was a decrease of maximal hyperemic coronary blood flow, and high production of nitric oxide, that, probably, specifies its insufficient biological activity in coronary vessels in these conditions. After 6 hours of immobilization, the dysfunction of endothelium characterized by hyperproduction of endothelium relaxations factors was observed described by us earlier. Decrease in tone of coronary vessels as a result of N-acetyl- L-cysteine action was observed not only after 0,5-6 hours stress, but also in the control rats that allows to assume that any basal level of NO deposition in